

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA**

**PREVALENCIA DE *Salmonella spp* EN MUESTRAS DE LECHE CRUDA DE
EMPRESAS GANADERAS DOBLE PROPOSITO DEL DEPARTAMENTO DE
CÓRDOBA-COLOMBIA**

CARLOS ELIÉCER MARTÍNEZ NÚÑEZ

NOVIEMBRE DE 2014.

RESUMEN

La leche cruda es aquella que no ha sido sometida a ningún proceso de termización o esterilización, siendo considerada una de las principales vías de transmisión de microorganismos patógenos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). En el presente estudio se determinó la prevalencia de *Salmonella spp* en muestras de leche cruda de empresas ganaderas doble propósito del departamento de Córdoba, seleccionadas por muestreo no probabilístico y estudiadas de manera longitudinal. Se recolectó una muestra de leche de cantina en máxima y mínima precipitación de cada una de las 149 empresas pertenecientes al estudio. Se determinó la presencia de *Salmonella spp* por aislamiento convencional establecido por el INVIMA, a las cepas sospechosas se les realizó pruebas bioquímicas, confirmadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante la determinación del gen *InvA*. Todos los datos obtenidos fueron procesados mediante el paquete estadístico SAS.

En el 1,34 % (2/149) y en el 2,01 % (3/149) de las muestras procesadas en mínima precipitación y máxima precipitación respectivamente se detectó la presencia *Salmonella spp*, la cual fue aislada por bacteriología convencional y confirmada molecularmente mediante la detección del gen *InvA*, el cual amplificó para un región de 284 pb. De las cepas aisladas se estableció que el 60 % (3/5) correspondió a muestras tomadas en mínima precipitación y el 40% restante (2/5) a muestras obtenidas en máxima precipitación.

La presencia de *Salmonella spp* en leche cruda puede convertirse en un riesgo para la salud humana, motivo por el cual es evidente que la aplicación de buenas prácticas de manejo y de condiciones higiénico sanitarias contribuirá de manera directa en la disminución de la contaminación de la leche por *Salmonella spp*.

ABSTRACT

Raw milk is one that has not been subjected to any process of sterilization or thermisation, being considered one of the main routes of transmission of pathogens causing food (ETA) diseases. The present study determined the prevalence of *Salmonella* in samples of raw milk from dual purpose livestock enterprises Córdoba department, selected by non-probability sampling and studied longitudinally determined. Was collected a tank milk sample in maximum and minimum rainfall of each of the 149 companies belonging to the study. *Salmonella* spp was determined by conventional insulation provided by INVIMA, the suspected strains underwent biochemical tests, confirmed by Polymerase chain reaction (PCR) by determining the *InvA* gene. All data were analyzed using the statistical package SAS version 8.

At 1.34% (2/149) and 2.01% (3/149) of the samples processed at low rainfall and maximum rainfall respectively *Salmonella* presence was detected, which was isolated and confirmed by conventional bacteriological molecularly *InvA* by detecting the gene, which amplified for 278 bp region. Of the isolates was established that 60% (3/5) corresponded to samples from low rainfall and the remaining 40% (2/5) of samples obtained in maximum precipitation.

In conclusion, the presence of *Salmonella* in raw milk can be a risk to human health, why is obvious that the application of good management practices and sanitary conditions contribute directly to the reduction of pollution from milk *Salmonella* spp.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.

2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.1 *Salmonella spp*

2.1.1 Mecanismos de invasión

2.1.2 Clínica de la salmonelosis

2.2 LECHE

2.2.1 Calidad microbiológica de la leche

2.3 Detección de *Salmonella spp* en alimentos

2.3.1 Implementación de reacción en cadena a la polimerasa

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4. METODOLOGÍA PROPUESTA

4.1 TIPO DE ESTUDIO

4.2 LUGAR DE ESTUDIO

4.3 UNIVERSO

4.4 POBLACIÓN DE ESTUDIO

4.5 MUESTRA

4.6 TAMAÑO DE MUESTRA

4.7 CONFIDENCIALIDAD

4.8 CRITERIOS DE SELECCIÓN

4.8.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

4.8.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

4.9 TOMA DE MUESTRA

4.10 DETERMINACIÓN DE *Salmonella spp.*

4.10.1 EXTRACCIÓN DE ADN

4.10.2 Confirmación de *Salmonella spp* por PCR

4.11 CONSERVACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS

4.12 ANÁLISIS DE RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS EMPRESAS GANADERAS

5.2 DETERMINACIÓN DE *Salmonella spp* EN MUESTRAS DE LECHE CRUDA PROVENIENTES DE EMPRESAS GANADERAS DEL DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA

5.3 DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIOTICOS PARA *Salmonella spp*

6. DISCUSIÓN.

7. CONCLUSIONES

8. RECOMENDACIONES.

9. BIBLIOGRAFÍAS.

10. ANEXOS.

TABLAS

1. Microorganismos involucrados en toxiinfecciones alimentarias según periodo de incubación.
2. Características de las instalaciones de ordeño de las empresas involucradas en el estudio.
3. Manejo sanitario por el total de empresas ganaderas y centros de acopio involucrados en el estudio.
4. Características de la producción de leche cruda en las empresas ganaderas involucradas en el estudio.

GRÁFICOS

1. Distribución de las empresas ganaderas involucradas en el estudio por centro de acopio
2. Frecuencia de realización del CMT por las empresas ganaderas
3. Manejo de la leche procedente de vacas que reciben tratamiento con antibióticos
4. Aislamientos y confirmación por PCR en las muestras positivas en temporada de mínima y máxima precipitación.

FÍGURAS

1. Distribución de las empresas ganaderas involucradas en el estudio por municipios.
2. PCR para detección del gen *InvA* de *Salmonella spp.*

1. INTRODUCCIÓN

La leche cruda como alimento resulta peligrosa para la salud humana, aumentándose el riesgo en los niños pequeños y en los ancianos así como en mujeres embarazadas y personas cuyo sistema inmunológico presente deficiencias como en el caso de las personas con VIH/SIDA, lo anterior, debido a que el producto no cuenta con procesos de pasteurización y/o higienización requeridos para garantizar la inocuidad y calidad de la misma. Encontramos que muchos alimentos pueden ser causantes de enfermedades siendo la leche uno de los más peligrosos, considerando como contaminado al alimento que contiene agentes y/o sustancias extrañas de cualquier naturaleza en cantidades superiores a las permitidas en las normas nacionales o en su defecto en normas reconocidas internacionalmente (Decreto 3075 1997), la contaminación puede deberse a diversos factores tales como el contacto directo de las heces de la vaca con la leche, la infección de las ubres (mastitis), contaminación cruzada a partir de la vestimenta o el calzado de los seres humanos. Entre los brotes asociados al consumo de productos lácteos notificados a los CDC entre 1973 y 2008, las personas que investigaron señalaron si el producto era crudo o pasteurizado, encontraron que el 82 % se debieron a leche cruda o queso (Especiales CDC).

La salmonelosis constituye una carga de salud pública y representa un costo masivo a la sociedad en muchos países, anualmente se notifican millones de casos que dan lugar a miles de muertes (INFOSAN 2005). A partir de 1993 se reportaron en Estados Unidos más de 70 brotes causados por consumo de leche cruda afectando a más de 1500 personas, originando 185 hospitalizaciones y provocando 2 casos de muertes; se estima que el número de enfermedades asociados al consumo de leche cruda puede ser mayor (Search of NY 2012).

En el año 2011 hasta el periodo epidemiológico 13 se presentaron 24 brotes de *Salmonella spp* en el país; en el año 2012, en el país se notificó al Sistema

nacional de vigilancia por archivos planos (colectivo) 11836 casos de enfermedades transmitidas por alimentos, involucrados en 1004 brotes; de los cuales, el 51% de los casos se encuentran asociados a la identificación de algún agente etiológicos (INS 2012). Los CDC informaron que la leche sin pasteurizar tiene 150 veces más de probabilidades de causar ETA y genera 13 veces más hospitalizaciones que las enfermedades que involucran productos lácteos pasteurizados (FDA 2012).

Entendida la magnitud de la salmonelosis como un problema de salud pública a nivel mundial existe claramente la necesidad de que se implementen estrategias de vigilancia epidemiológica que incluyan la determinación de prevalencia en alimentos de impacto en salud pública como lo es el caso de la leche cruda y se contribuya de esta manera a la instauración de medidas de vigilancia epidemiológica, diagnóstico, prevención y control, de la infección por *Salmonella* en el departamento de Córdoba.

Las ETAS a través del tiempo se han convertido en un problema sanitario generalizado y creciente a nivel mundial, tanto en países subdesarrollados como desarrollados, siendo los primeros los más afectados por la problemática. La alta prevalencia de enfermedades diarreicas en países en vía de desarrollo sugiere que los principales problemas de fondo son a nivel de seguridad alimentaria. *Salmonella spp* sigue siendo causa de muchos brotes; en Colombia la tendencia de ETA en los últimos años ha ido en aumento (INS 2014). La incidencia ha aumentado posiblemente por la mejora en la notificación pero al ser comparada con información de otros países, la incidencia está por debajo de la media mundial, lo cual puede deberse al sub-registro en el sistema de salud, también cabe anotar que no se establece la existencia de picos epidemiológicos relacionados con las estaciones ya que los datos reportados por el INS son anuales (Min. Protección Social 2012).

Desde hace tiempo se reconoce que la contaminación de los alimentos para animales, del medio ambiente (agua, roedores, insectos, aves) y de los productos de origen animal, tienen un desempeño fundamental en el ciclo infeccioso de

Salmonella spp (Kampelmacher 1983). Por lo anterior debe minimizarse las posibles fuentes de contaminación, para garantizar la inocuidad del producto.

Se hace imprescindible el control y monitoreo de los alimentos mediante la vigilancia de éstos en el transcurso de la cadena de producción. Con la determinación de la prevalencia de *Salmonella spp* en leche cruda, se pueden establecer medidas de prevención, control, vigilancia y diagnóstico con el fin de reducir los casos de ETA por este microorganismo en el departamento de Córdoba.

2. MARCO TEORICO

La enfermedad transmitida por alimentos (ETA), es el síndrome originado por la ingestión de alimentos, incluida el agua, que contienen agentes etiológicos en cantidades tales que afectan la salud de consumidor a nivel mundial o en grupos de población; las alergias de hipersensibilidad individual no se consideran ETA. Se pueden dividir en dos tipos: las ocasionadas por infecciones alimentarias y las producidas por intoxicaciones debido a toxinas. Las ETA constituyen un problema sanitario a nivel mundial teniendo incidencia tanto en la salud de las personas como en el ámbito económico debido a la repercusión que tiene sobre las pérdidas que se generan y el costo del tratamiento (Kopper 2009).

En la década de 1990 la Organización Panamericana de la Salud (OPS) desarrolló el Sistema de Información para la Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (SIRVETA). Con la implantación de este sistema los países se beneficiaron tanto en vigilancia como en la capacidad del laboratorio en relación con la inocuidad de los alimentos. En el año 2000 se estableció la 53ª Asamblea Mundial de la Salud, estableciéndose la inocuidad de los alimentos como una prioridad motivada por la aparición de diversos brotes a nivel global (Castro, Guía Veta)

Dentro de los microorganismos causantes de infección alimentaria se encuentran: *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Campylobacter spp*, *Listeria spp*, *Yersinia spp*, entre otros.

Son microorganismos causantes de intoxicación alimentaria: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* entero hemorrágica, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Clostridium botulinum*, *Vibrio spp* y *Bacillus cereus*.

En la tabla 1 se presentan los microorganismos involucrados en toxiinfecciones alimentarias clasificados según período de incubación, el cual varía de acuerdo al tipo de microorganismo presentando así mismo diferentes síntomas dominantes:

Tabla 1. Microorganismos involucrados en toxiinfecciones alimentarias según período de incubación

Período de Incubación	Síntomas	Microorganismos
1-6 horas	Náuseas y vómitos	<i>S. aureus</i> ; <i>B. cereus</i>
8-16 horas	Cólico y diarrea	<i>C. perfringens</i> ; <i>B. cereus</i>
16-48 horas	Fiebre, cólico, diarrea (Puede ser con sangre)	<i>Salmonella</i> ; <i>Shigella</i> ; <i>Escherichia coli</i> <i>enteroinvasiva</i> ; <i>Campylobacter yeyuni</i> ; <i>Vibrio parahemolítico</i> ; <i>Yersinia enterocolítica</i>
16-72 horas	Cólico y diarrea acuosa	<i>Escherichia coli</i> <i>enterotoxigénica</i> , <i>Vibrio</i> <i>cholerae</i>
18-36 horas	Náuseas, vómitos, diarrea y parálisis	<i>Clostridium botulinum</i>
72-120 horas	Diarrea con sangre sin fiebre	<i>Escherichia coli</i> <i>enterohemorrágico</i>

Tomada de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) disponible en <http://www.bvsops.org.uy/pdf/etas.pdf>

2.1 *Salmonella spp*: Los miembros de este género presentan forma bacilar, son Gram negativos, con un tamaño que oscila entre 0,7- 1,5 x 2,0 – 5,0 µm, móviles peritricos, anaerobios facultativos, no esporulados (Conde 2004). P.R Edwards y H. W Ewing, en la cuarta década del siglo XX, se atrevieron a definir e identificar las primeras cepas del género *Salmonella*. La especie entérica está constituida por 6 subespecies: *S. entérica subespecie entérica*, *S. entérica subespecie salamae*,

S. entérica subespecie arizoe, *S. entérica subespecie diarizonae*, *S. entérica subespecie houtenae*, *S. entérica subespecie indica* (Durango et al 2004). Las subespecies presentan aproximadamente 2.700 serovariedades que se encuentran definidas en función de sus asociaciones de factores antigénicos somáticos O y flagelares H (Min. Protección Social 2011).

Entre las propiedades de crecimiento encontramos que se desarrollan óptimamente a 37°C, catabolizan la glucosa, manitol, maltosa y sorbitol, produciendo ácido y gas. Son bacterias no fermentadoras de lactosa y carecen de la enzima triptofanasa. Reaccionan de manera positiva ante la prueba de catalasa y de manera negativa a la oxidasa, son productoras de H₂S, descarboxilan la lisina y la ornitina, utilizan el citrato como única y exclusiva fuente de carbono y no hidrolizan urea, cabe destacar que estas propiedades han sido utilizadas para la identificación bioquímica, sin embargo algunas de estas pruebas presentan sus excepciones (Casado 2012).

Los miembros del género se pueden clasificar en tres grupos:

- Los que no tienen preferencia por algún huésped, infectando tanto a humanos como a los animales. Se encuentran en este grupo la mayoría de las serovariedades causantes de salmonelosis.
- Los que infectan solo al *hombre*: *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *Salmonella paratyphi C*.
- Los que están adaptados a un huésped animal: *S. abortusovis*, a los bovinos *S. abortusequi*, a los equinos y *S. gallinarum*, a las aves (Caffer 2008).

El término salmonelosis se refiere al conjunto de enfermedades causadas por el género *Salmonella spp*, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae; siendo *S. entérica* y *S. bongori* las únicas dos especies pertenecientes a este género de las enterobacterias, comprendiendo actualmente cerca de 2700 serovares, debiendo su movilidad a la presencia de flagelos peritricos a excepción del serovar *gallinarum- pollorum* (Brunia 2008).

En la Salmonelosis es fundamental la rehidratación y el control electrolítico, no se recomienda el uso de antibióticos (excepto en casos excepcionales) ya que se ha demostrado que su uso prolonga la excreción fecal de *Salmonella spp*, elevando así la incidencia de portadores y favoreciendo la adquisición de resistencias antibióticas por parte de la bacteria (D' Aoust 1991, Hohmann 2001).

2.1.1 Mecanismos de Invasión: Cuando la bacteria se acerca a la superficie epitelial, las microvellosidades circundantes empiezan a degenerarse con elongación, edema y crecimiento en un proceso llamado ruffling (rizado) aquí, los efectores interactúan con las proteínas de la célula hospedera para reorganizar el citoesqueleto de actina e inducir cambios morfológicos que en últimas causan que estas células, normalmente no fagocíticas, internalicen la bacteria en un proceso de invasión (Cardona 2005).

La adherencia tiene un papel fundamental en la patogénesis de *Salmonella spp* producto de varios tipos de adhesinas donde están incluidas fimbrias tipo I codificadas por el gen *fim*.

Salmonella spp posee la capacidad de invadir diversas líneas celulares, dicho proceso de invasión es efectuado por un mecanismo mediado por "ruffling", encontrando que *Salmonella spp* puede estimular más de un camino para la transducción de señales, promocionando de tal forma la entrada a las células huésped (Figuerola y Verdugo 2006).

Salmonella spp al igual que *Escherichia coli enteropatogénica*, tiene un mecanismo similar a una jeringa que se denomina Sistema de secreción tipo III el cual sirve para inyectar proteínas en el plasma celular; las proteínas inyectadas frecuentemente reensamblan factores eucarióticos con funcionamiento de señales de transducción y son capaces de interferir con vías de señalización de la célula hospedera, produciéndose la fagocitosis de la bacteria por parte de la célula, el proceso termina con la bacteria englobada por una vacuola fabricada por la misma célula.

El gen *InvA* codifica para una proteína (del mismo nombre) de membrana interna, que se encuentra relacionada con la formación de un canal, esta proteína es considerada como una de las más importantes en el ensamblaje del sistema de secreción tipo III y en la exportación de proteínas efectoras, lo cual ha sido demostrado por una variedad de estudios utilizando mutantes del gen *InvA*; el gen *InvA* es el primer gen de un operón que contiene también los genes *InvB* e *InvC*. Con el paso del tiempo está más claro que las investigaciones epidemiológicas sobre genes de factores de virulencia de las bacterias son esenciales para comprender las anomalías ocasionadas por este tipo de microorganismos (Derakhshaded 2013).

2.1.2 Clínica de la salmonelosis: Se caracteriza por náuseas, vómitos y diarrea de moderado volumen y sin sangre, cabe resaltar que la presencia de diarrea en humanos es una incógnita debido a que no se ha identificado una enterotoxina capaz de producir la diarrea (Conde 2004), con frecuencia se asocia fiebre, dolor abdominal tipo cólico, se trata de un cuadro autolimitado que se resuelve en 3-7 días. Una vez se supera el cuadro, el paciente queda como portador por el lapso de 4-5 semanas dependiendo del serotipo y del tratamiento antibiótico (INS 2014).

2.2 LECHE: Es el producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos, bufalinos y caprinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños completos, sin ningún tipo de adición, destinada al consumo en forma de leche líquida o a la elaboración posterior. Siendo de este modo la leche cruda aquella que no ha sido sometida a ningún tipo de termización ni higienización; la leche cruda no debe presentar residuos de antibióticos en niveles superiores a los límites permisibles, determinados por la autoridad sanitaria competente de acuerdo con la metodología que se adopte a nivel nacional (Dec. 616 2006).

Por lo citado en líneas anteriores de hace indispensable implementar las buenas prácticas higiénicas (BPH), con el fin de disminuir la contaminación de la leche, debido a que gérmenes como *Escherichia coli* O157-H7, *Campylobacter* y *Salmonella* pueden contaminar la leche durante el proceso de ordeño de animales lecheros como vacas.

2.2.1 Calidad microbiológica de la leche: La calidad microbiológica se refiere a la concentración de las bacterias de la leche, presencia de microorganismos patógenos, de residuos de antibióticos y medicamentos (inhibidores); que pueden afectar la salud humana y los procesos de transformación de la leche. Conteos altos de bacterias y de células somáticas, producen alteraciones en las propiedades nutritivas y organolépticas de la leche y reducen la vida útil de los derivados lácteos. El decreto 1880 establece los parámetros microbiológicos de calidad de leche cruda (Patiño 2012).

Las bacterias patógenas que tradicionalmente han preocupado en mayor medida a los microbiólogos de alimentos son: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp* y *Clostridium botulinum*. Sin embargo, en los últimos años, diversos microorganismos han ganado una gran importancia como agentes causantes de toxiinfecciones alimentarias. Entre estos microorganismos denominados patógenos “emergentes” se incluyen *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* enterotoxigénico y *Campylobacter jejuni*. Así mismo, como consecuencia del abuso de antibióticos en medicina y animales de abasto, se está observando un aumento considerable en la aparición de patógenos alimentarios multirresistentes a antibióticos.

2.3 DETECCIÓN DE *Salmonella spp* EN ALIMENTOS: La recuperación de *Salmonella spp* se dificulta porque no es detectable en alimentos que tienen baja carga bacteriana y los métodos tradicionales para recuperación del microorganismo, aislamiento en medios selectivos, identificación bioquímica y caracterización serológica tienen baja sensibilidad, especificidad y consumen mucho tiempo (Acosta 2013). En el laboratorio la recuperación se da mediante procesos de pre-enriquecimiento, enriquecimiento en las etapas preliminares y siembra posterior en agares selectivos, realización de pruebas bioquímicas y serotipificación; difiriendo en alimentos la etapa de pre-enriquecimiento, del método utilizado en muestras clínicas debido a factores como, número de células menor que en muestras clínicas, los procesos tecnológicos que se aplican a los alimentos debilitan a la bacteria y la constitución propia del alimento (nutrientes, pH, aw) influyen en la supervivencia o en la multiplicación de *Salmonella spp*.

La importancia que adquiere *Salmonella* en los alimentos es notable; siendo la detección de esta bacteria esencial, los métodos estandarizados para la detección de los alimentos, por ejemplo mediante normas ISO son los métodos de referencia, basándose en la mayor parte en métodos tradicionales de cultivos baratos pero largos y laboriosos (Kopper 2009). Los criterios para la identificación bioquímica de *Salmonella spp* están ampliamente descritos, sin embargo estas pruebas dependen de la expresión fenotípica de las características analizadas y pueden verse afectadas por variaciones en los medios de cultivo y en las condiciones de incubación (Caffer 2008).

Se consideran técnicas de tipificación de *Salmonella spp* la determinación de susceptibilidad antimicrobiana y la fagotipificación, las cuales pueden establecer relaciones epidemiológicas. Las técnicas de subtipificación molecular como electroforesis en gel de campo pulsado se consideran el Gold Standard para diferenciación y aislamiento de un serotipo específico de *Salmonella spp* (Muriel 2008).

El análisis genético de los factores de virulencia en bacterias patógenas ha demostrado utilidad ya que muchos genes asociados como los de invasividad estarían relacionados, encontrándose codificados en regiones especiales como la isla de patogenicidad 1 (SPI1) la cual confiere a *Salmonella spp* la capacidad de invadir células epiteliales. El gen *InvA* es un gen de invasión conservado entre los serotipos de *Salmonella spp* (Dias 2003), con la PCR se puede detectar en *Salmonella spp* genes de invasividad como el gen *InvA*, *agfA*, *iagAB*, *InvF*, *InvH* en heces y alimentos en menor tiempo comparado con métodos de cultivo tradicionales y confirmación serológica que toman de 5-7 días (Díaz 2010).

-La identificación de *Salmonella spp* y la detección de genes basados a través de PCR aportan beneficios en salud pública en el rápido diagnóstico, etiología, epidemiología, investigaciones, vacuna ideal y desarrollo del tratamiento, sugiriendo que la detección del gen *InvA* es específico para detección de *Salmonella spp* (Amini 2010).

2.3.1 Implementación de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Con el pasar del tiempo se ha demostrado con diferentes estudios la utilidad de la PCR, la cual facilita el estudio y/o diagnóstico microbiológico. Un estudio realizado en la ciudad de Santa Marta en 2013, tomando un total de 65 muestras de diversos alimentos, a los cuales les realizó inmunoensayo enzimático y PCR, detectando *Salmonella spp* en 5 muestras; (7,7 %) (Solo productos cárnicos) y en 36 muestras; (55,4 %) (Res, embutidos, pollo, pescado, harinas, lácteos, salsas y ensaladas) respectivamente para cada una de las técnicas empleadas con este estudio demostraron que la PCR ofrece alta sensibilidad y especificidad en la detección de *Salmonella spp* en alimentos, beneficiando así tanto el sector salud como los diagnósticos rápidos y precisos (Acosta 2013).

En un estudio de Estandarización de una PCR para la detección del gen *InvA* de *Salmonella spp* en lechuga recomiendan que la estandarización de una PCR se realice en cada laboratorio y para cada matriz utilizada, con el fin de que se adapte a las condiciones del laboratorio (Chacón 2012).

En un estudio relatan con respecto a la detección de *Salmonella spp*, el hecho de que una de las muestras que resultó positiva por medio de PCR, se encontró sospechosa mediante análisis bacteriológico, sin embargo, arrojó resultados negativos a las pruebas bioquímicas para su identificación (Alcázar 2006), por lo cual estos resultados tienen relevancia debido a la cabida que tiene la utilización de la técnica de PCR, ya que su sensibilidad es mayor que los métodos bacteriológicos.

Así la importancia de generar productos inocuos radica en la posibilidad de comercializarlos con un margen de certeza sobre su procedencia y calidad sanitaria, lo cual se traduce en un grado de confianza de los consumidores hacia los productos que adquieren (Yáñez 2008).

3. CONTEXTO EPIDEMIOLÓGICO

Las infecciones causadas por *Salmonella spp* constituyen un problema de salud pública a nivel mundial, afectando con mayor severidad a niños menores de 5

años y ancianos, así como a personas en estado de inmunosupresión. Las salmonelosis no typhi se presentan básicamente como resultado de la ingesta de alimentos contaminados con estos microorganismos (Saravia 2008). La salmonelosis es ocasionada por la ingesta de un inóculo de 10^6 - 10^8 bacterias en carne infectada, pollo, leche cruda, huevos y productos que contengan huevo, repollo y otros alimentos de los cuales se tenga sospechas, para que se desarrolle enfermedad sintomática, otros factores como el tipo de cepa y el estado fisiológico del hospedero, favorecen o no el desarrollo de la enfermedad (Parra 2002).

Hasta la semana 35 del año en curso 2014 se notificaron al SIVIGILA 6847 casos de ETA, involucrados en 443 brotes con promedio de 12,7 brotes por semana observando una disminución en la notificación del 20% con respecto a las mismas semanas de 2013 donde se presentaron 554 brotes y 6639 casos. De las 36 entidades territoriales el 86,1 % notificó brotes de ETA y el análisis por entidad territorial de procedencia Bogotá (15,3 %), Sucre (10,4 %), y Cesar (9 %) fueron las que presentaron un mayor número de brotes. Para la semana en mención se notificaron 9 brotes que involucran 62 casos, Las entidades que los notificaron fueron: Caldas, Sucre, Antioquia, Bogotá y Norte de Santander y los principales factores de riesgo identificados fueron inadecuado almacenamiento, fallas en la cadena de frío, inadecuada conservación, fallas en la higiene personal, malas condiciones ambientales, uso de agua no potable, contaminación cruzada y fallas en la limpieza de utensilios. Los agentes etiológicos detectados en muestras biológicas y muestras de alimentos procedentes de brotes de ETA fueron:

Escherichia coli, *Fasciola hepática*, *Salmonella spp*, *Salmonella Typhi*, *Shigella sp*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Endolimax nana*. (BES 35, 2014).

Entre 1998 y 2008 se notificaron 86 brotes ocasionados por la ingesta de leche o productos lácteos crudos, dejando un resultado de 1676 enfermedades, 191 hospitalizaciones y 2 muertes (Especiales CDC).

En Colombia en el año 2005 el sistema nacional de vigilancia en salud pública (SIVIGILA) reportó 7941 casos de ETA. En Uruguay en 1995 *Salmonella spp* se consideró como reemergente, representando ETA en Latinoamérica el 70 % los

casos de diarrea (Aliverti 2012). En el año 2012 en Colombia fueron notificados al Sistema Nacional de Vigilancia 11836 casos de ETAS, involucrados en 1004 brotes donde en el 51 % de los casos se identificó el agente etiológico, los alimentos más relacionados con el evento fueron: alimentos mixtos (430 brotes) en segundo lugar leche, productos lácteos y derivados (173 brotes) siendo los agentes etiológicos detectados en muestras biológicas, de alimentos o superficies, de brotes de ETA en notificación colectiva: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* (INS 2011).

La región latinoamericana experimentó alrededor de 6.000 brotes de diversos tipos de enfermedades de origen alimentario entre 1993 y 2002 según las cifras ofrecidas por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS).

En febrero de 2011 se presentó un brote de *Salmonella enteritidis* en Chile donde el número de casos fue 6 veces mayor al promedio de personas afectadas en cada brote durante los años 2006-2007, en 2007 se hospitalizaron 93 personas de las cuales fallecieron dos pacientes, con letalidad estimada de 0,04 % y mortalidad de 0,0025 por 100000 habitantes (García 2012).

En Estados Unidos se estima que el promedio de casos anuales de ETA por *Salmonella spp* es de 3 millones representando más del 50 % de los brotes de gastroenteritis de tipo bacteriano (Díaz 2010). El costo anual de las ETAS es de 5 a 6 mil millones de dólares (CDC) en gastos médicos y pérdida de productividad. *Salmonella spp* representa por si sola mil millones de dólares anuales directos e indirectos en los costos médicos. Cuando se conoce el número de casos y es posible determinar el agente causal es factible determinar el costo de las ETA de un país (Castro y Mosquera 2012).

De acuerdo a brotes en California los casos por infección de *Salmonella dublin* en la década de 1970 hasta principios de 1980 se asociaron con el consumo de leche cruda. Dos brotes de infecciones por *Salmonella* multirresistente fueron asociados

con la ingesta de queso estilo mexicano sin pasteurizar en 1997, dando como resultado más de 100 casos confirmados mediante cultivo (Search of NY 2012).

En un estudio realizado en México en 1989 se determinó la ocurrencia de 79 brotes de los cuales 58 fueron confirmados, correspondiendo el 29% de los brotes a consumo de quesos y otros derivados lácteos (Parrilla 1993).

Entre 1998 y 2003 los reportes de ETA por leche tuvieron una frecuencia de 19 con un número de personas afectadas de 30; por queso la frecuencia fue de 26 afectando 692 personas y en cuanto a derivados lácteos la frecuencia fue de 71 afectando solamente 4 personas (Muriel 2008).

En un estudio realizado en la ciudad de Santa Marta, se analizaron 65 muestras de alimentos, aislándose *Salmonella spp* en 36 de estos, asociando 4 aislamientos a lácteos (Acosta 2013).

Un estudio realizado en la región del Caribe colombiano se encontró *Salmonella spp* en 9 muestras de quesos de los 74 aislamientos que se obtuvieron en 1300 muestras analizadas de diferentes alimentos (Espinal 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia de *Salmonella spp* en muestras de leche cruda de empresas ganaderas doble propósito del departamento de Córdoba-Colombia.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Aislar y caracterizar por bacteriología convencional *Salmonella spp* en leche cruda en empresas ganaderas doble propósito que proveen centros de acopio en el departamento de Córdoba.

Confirmar por biología molecular los aislamientos de *Salmonella spp*, obtenidos a partir de leche cruda de empresas ganaderas doble propósito que proveen centros de acopio en el departamento de Córdoba.

Conformar un banco de aislados de *Salmonella spp* provenientes de leche cruda de empresas productivas doble propósito que proveen centros de acopio del departamento de Córdoba-Colombia.

4. METODOLOGÍA PROPUESTA

4.1 TIPO DE ESTUDIO: Descriptivo de corte longitudinal

4.2 LUGAR DE ESTUDIO: Departamento de Córdoba, localizado al noroeste de Colombia, a 8°45' de latitud norte y 75°53' de longitud oeste. Tiene una altitud promedio de 18 metros sobre el nivel del mar. Temperatura promedio de 28°C y una precipitación anual de 1156 mm (Ins. Geográfico Agustín Codazzi 2009)

4.3 UNIVERSO: Fincas de ganado bovino doble propósito del departamento de Córdoba.

4.4 POBLACIÓN DE ESTUDIO: Fincas productoras de leche cruda del departamento de Córdoba.

4.5 MUESTRA: Leche cruda proveniente de fincas doble propósito del departamento de Córdoba.

4.6 TAMAÑO DE LA MUESTRA: Para establecer el número de las muestras a tomar, se determinó la cantidad de empresas ganaderas doble propósito en el departamento de Córdoba, la cual fue estimada en 19.097 unidades productoras tipo doble propósito, tomando una prevalencia del 10% y una confiabilidad del 95% y con una amplitud de intervalo del 0.1, lo cual dio un total de 138 fincas o unidades productoras. Se tomó una muestra en máxima y mínima precipitación.

4.7 CONFIDENCIALIDAD: Los datos obtenidos de las empresas fue maneja bajo estricta confidencialidad.

4.8 CRITERIOS DE SELECCIÓN: La selección fue realizada bajó los siguientes criterios:

4.8.1 Criterios de inclusión: Que los participantes del estudio sean empresas ganaderas ubicadas en el departamento de Córdoba, cuyos propietarios hayan firmado consentimiento informado.

- Que los participantes del estudio sean empresas ganaderas de sistema doble propósito.

4.8.2 Criterios de exclusión:

- Empresas ganaderas que estén ubicadas fuera del departamento de Córdoba
- Empresas ganaderas de producción especializada.

4.9 TOMA DE MUESTRA: Previo consentimiento informado del dueño de la empresa ganadera y diligenciamiento de una encuesta (Anexo 1) sobre aspectos de manejo sanitario y productivo; se realizó un muestreo en época de máxima y mínima precipitación en estas empresas que proveen centros de acopio en el departamento de Córdoba. La toma de la muestra de leche, se llevó a cabo conforme a lo establecido por FIL-IDF 50C, 1995 en “Muestreo de leche y productos líquidos lácteos”. La leche almacenada en los silos, antes de ser muestreadas se sometieron a una agitación mecánica de 5 minutos, si la muestra se tomó dentro de los 30 minutos después de llenado el silo; si la toma de muestra se realizó en un tiempo posterior, la agitación mecánica fue por lo menos de 15 minutos.

Las muestras fueron depositadas en recipientes estériles y conservadas en refrigeración a 4° C, hasta su transporte al laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Salud en la Universidad de Córdoba, donde se procesaron en menos de 24 horas después de su recolección. FIL-IDF 50C, 1995.

4.10 DETERMINACIÓN DE *Salmonella spp*: El aislamiento se realizó de acuerdo al protocolo del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, INVIMA (1998).

Para 225 ml de agua peptonada bufferada se agregaron 25 ml de leche cruda, se mezcló y se llevó a incubación por un tiempo estimado de 24 horas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en aerobiosis, transcurrido el tiempo mencionado se procedió a adicionar 500 μl de la mezcla a los tubos con Tetracionato y Selenite que son medios de enriquecimiento selectivo, se incubaron a 44°C por 18-24 horas en aerobiosis, se sembraron en

XLD y SS respectivamente mediante siembra por agotamiento y se incubó a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24-48 horas en aerobiosis. A los aislamientos sospechosos se les determinó perfil bioquímico y comportamiento frente a antibióticos por la técnica de MICROSCAM y detección del antígeno somático "O" específico para el género *Salmonella spp*, utilizando el antisuero BD difco™ QC Antigens *Salmonella O*.

4.10.1 Extracción de ADN: A partir de 5ml de cultivos de 24 horas de crecimiento se realizó extracción de ADN utilizando el kit "DNeasy Tissue Kit" QIAGEN, el protocolo que se siguió fue de acuerdo a las indicaciones del fabricante para bacterias Gram negativas.

Los cultivos fueron centrifugados por 20 minutos a 3500rpm a 4°C , Al pellet de bacterias se agregó 180 ml Buffer ATL y se mezcló hasta disolver, 20 ml de proteinasa K, fue adicionada y se mezcló por vortex, se incubó a 56°C hasta lisis completa. Se mezcló por vortex ocasionalmente durante el periodo de incubación para dispersar la muestra (cada 30 minutos). El tiempo de lisis varió usualmente de 1-2 horas. Se añadió 200 ml de Buffer AL a la muestra, y se mezcló 15 segundos en vortex e incubó a 70° por 10 min. Se añadió 200 ml de etanol absoluto (96 - 100%) a la muestra, y se mezcló 15 segundos en vortex. La mezcla anterior fue transferida dentro de la columna DNeasy spin, se Centrifugo a 8000 rpm por 2 minutos. Fue descartado lo que pasó por la columna y el tubo de recolección. La columna de DNeasy spin fue puesta en otro tubo de recolección de 2 mL, se añadió 500ml Buffer AW1, y se centrifugo por 2 minutos a 8000 rpm. Fue descartado lo que pasó por la columna y el tubo de recolección. La columna de DNeasy spin fue puesta en otro tubo de recolección de 2mL, se añadió 500 ml de Buffer AW2, y se centrifugo por 3 minutos a velocidad máxima para secar la membrana del Dneasy. Se descartó lo que pasó por la columna y el tubo de recolección. La columna de DNeasy spin fue puesta en un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 - 2 mL y se adiciono 200 ml de Buffer AE directamente a la membrana de Dneasy. Se incubó a temperatura ambiente por 1 min, y luego se centrifugo por 2 min a 8000 rpm para eluir. Las muestras de ADN fueron Conservadas a -20°C hasta la realización de la PCR.

4.10.2 Confirmación de *Salmonella spp* por PCR. Se determinó la presencia del gen *invA*, que codifica un componente esencial del aparato de secreción de proteínas asociadas con la invasión en cepas patógenas de *Salmonella spp*, se utilizaron los iniciadores: 5' (5'GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA3) y 3' (5'TCATCGCACCGTCAAAGGAACC3'), los cuales amplifican un fragmento de 284 pb de la secuencia conservada de los genes *inv* de *Salmonella*. Las concentraciones de la mezcla de PCR fueron las siguientes: Buffer de PCR 1X, MgCl₂ 2mM, dNTPs 0.2mM, iniciadores 0.4uM, Taq polimerasa 0.04U/ul, 1ul de muestra en 25ul de reacción,

Las condiciones del ciclo térmico fueron las siguientes:

- Denaturación Inicial 95°C X 5 minutos
- 30 ciclos: 95°C X 45 segundos, 55°C X 1 minuto, 72°C X 1 minuto
- Extensión final 72°C X 10 minutos

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con 0,5ug/ml de bromuro de etidio, empleando el sistema Gel Doc Software Quantity one (Bio Rad).

4.11 CONSERVACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS: Los aislamientos de *Salmonella spp* obtenidos a partir de muestras de leche se conservaron en BHI (Caldo infusión cerebro corazón) glicerol al 10% a -70°C.

4.12 ANÁLISIS DE RESULTADOS: Los datos obtenidos se analizaron a través de métodos descriptivos, estimando el promedio de cada variable y el promedio general, con sus respectivos errores de muestreo.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS EMPRESAS GANADERAS EN ESTUDIO

Un total de 149 empresas ganaderas, procedentes de los municipios de Planeta Rica, San Carlos, San Pelayo, Montería, Sahagún, Lórica, Ciénaga de Oro y Cereté, manejadas bajo el sistema doble propósito que proveen 3 centros de acopio del departamento de Córdoba participaron del estudio (Fig. 1, Gráfica 1). El 5.36% (8/149) de las empresas ganaderas usaron diferentes suplementos con el fin de satisfacer los requerimientos nutricionales y el 94.63% (141/149) manejan solamente pastoreo.

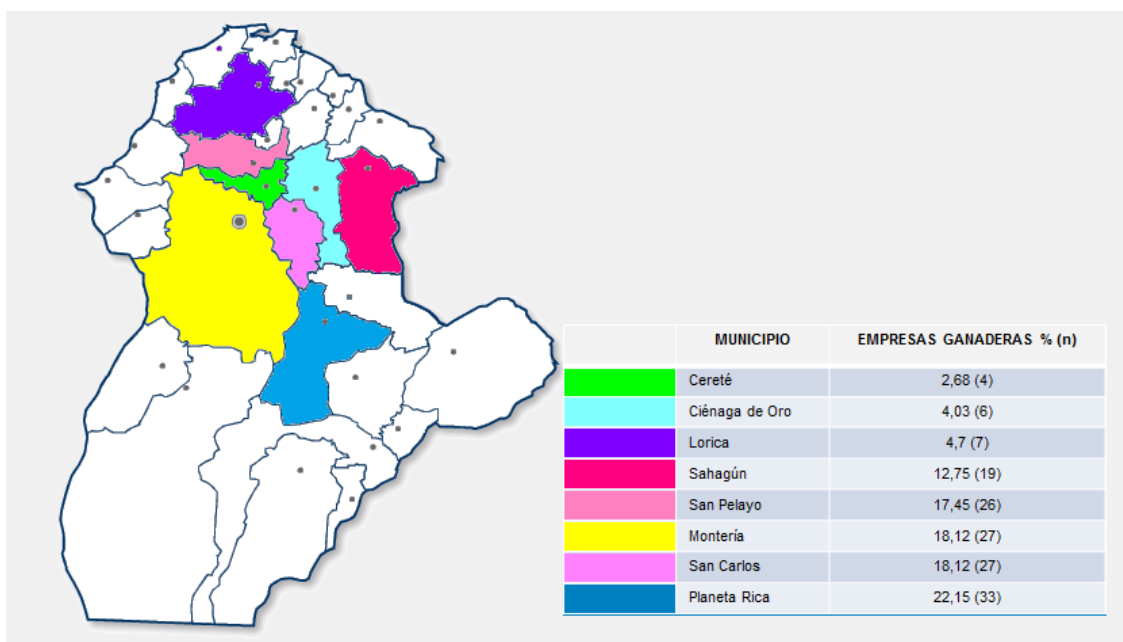
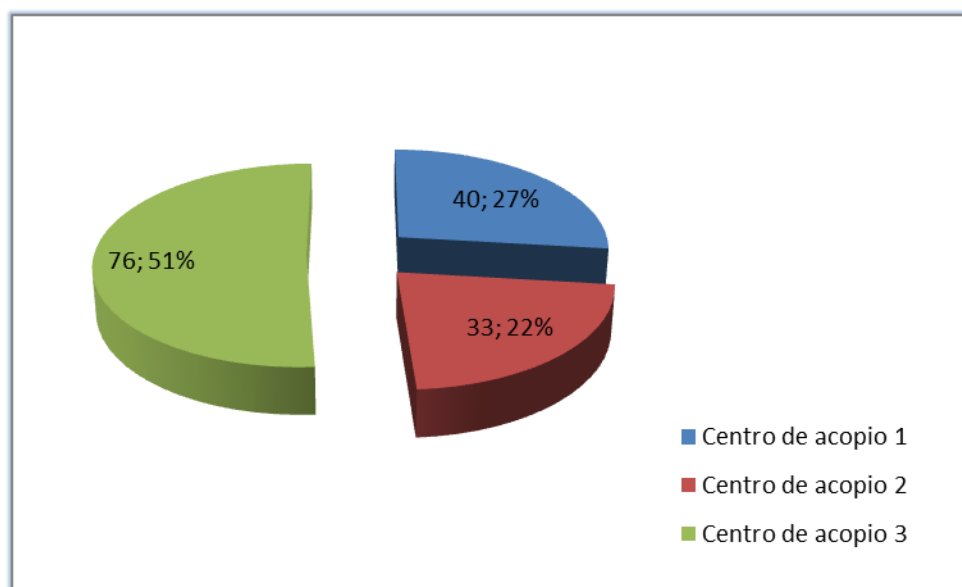


Figura No 1. Distribución de las empresas ganaderas involucradas en el estudio por municipios.

En las empresas ganaderas predominó el ordeño manual en un 99.3% (148/149) y menos del 1% (1/149) es de tipo mecánico, la labor es desempeñada por hombres en un 98,6% (147/149) y por mujeres en el 1.34% (2/149). El 96.64% (144/149)

cuenta con establo destinado para el ordeño y el 3.36% (5/149) no poseen. De las empresas que cuentan con establo el 59.06% (88/149) es cubierto y el 40.94% (61/149) es totalmente descubierto. Los pisos del lugar destinado para el ordeño en el 41.62% (62/149) son de cemento y el 58.38% (87/149) son de tierra.



Grafica No 1. Distribución de las empresas ganaderas involucradas en el estudio por centro de acopio.

Solamente el 2.01% (3/149) de las empresas cuentan con tanque de refrigeración frente a un 97.99% (146/149) que no poseen (Tabla 2). El 99.33% (148/149) filtra la leche. Los sistemas de filtro utilizados por estas empresas incluyen colador plástico 56.08% (83/149), filtro desechable 36,49% (54/149), tela 4.05%(6/149), colador metalico 2.03% (3/149) y filtro en línea 1.35%(2/149).

Tabla 2. Características de las instalaciones de ordeño de las empresas ganaderas involucradas en el estudio.

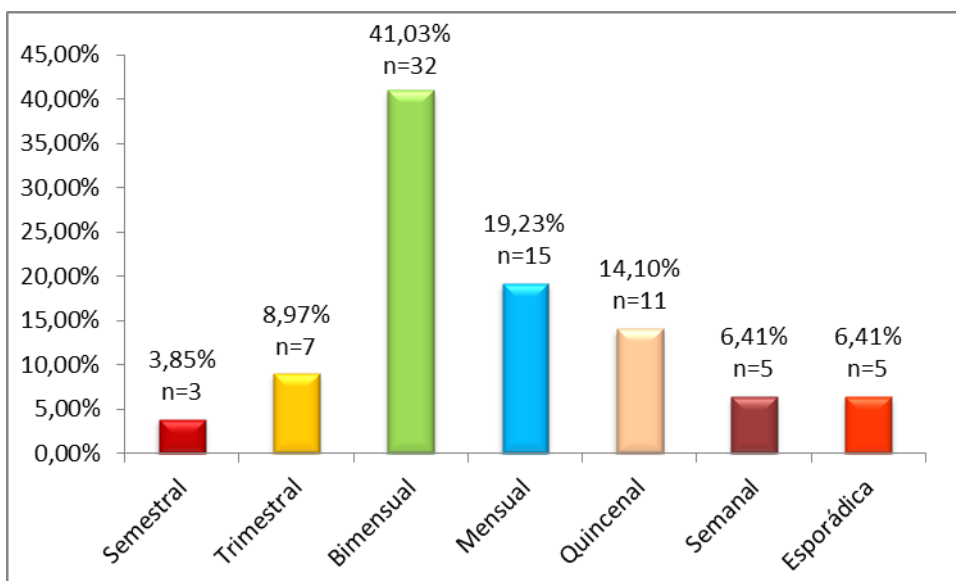
		Tanque %(n)	Establo %(n)	Cubierto %(n)
Centro de Acopio 1	Sí	2,01(3)	23,48 (35)	14,76 (22)
	No	24,83(37)	3,36 (5)	12,08 (18)
Centro de Acopio 2	Sí	0,00(0)	22,15(33)	22,15(33)
	No	22,15(33)	0,00(0)	0,00(0)
Centro de Acopio 3	Sí	0,00(0)	51,01(76)	22,15(33)
	No	51,01(76)	0,00(0)	28,86(43)
TOTAL	Sí	2,01(3)	96,64	59,06(88)
	No	97,99(146)	(144) 3,36(5)	40,94(61)

El manejo sanitario implementado en las empresas ganaderas incluyó, programa de hatos libres de Brucelosis, Tuberculosis, Control de Mastitis a través de la realización de la prueba de California Mastitis Test (CMT). La tabla 3 muestra el manejo sanitario.

Tabla 3. Manejo sanitario por el total de empresas ganaderas y centros de acopio involucrados en el estudio

		CMT %(n)	P. Brucelosis %(n)	P.Tuberculosis% (n)
Centro de Acopio 1	Sí	18,79(28)	12,75(19)	12,75(19)
	No	8,05(12)	14,09(21)	14,09(21)
Centro de Acopio 2	Sí	22,15(33)	22,15(33)	0,00(0)
	No	0,00(0)	0,00(0)	22,15(33)
Centro de Acopio 3	Sí	11,41(17)	6,71(10)	6,71(10)
	No	39,60(59)	44,30(66)	44,30(66)
TOTAL	Sí	52,35(78)	41,61(62)	19,46(29)
	No	47,65(71)	58,39(87)	80,54(120)

El 41,03% (n=32) realizan el CMT bimensual (Gráfica 2).



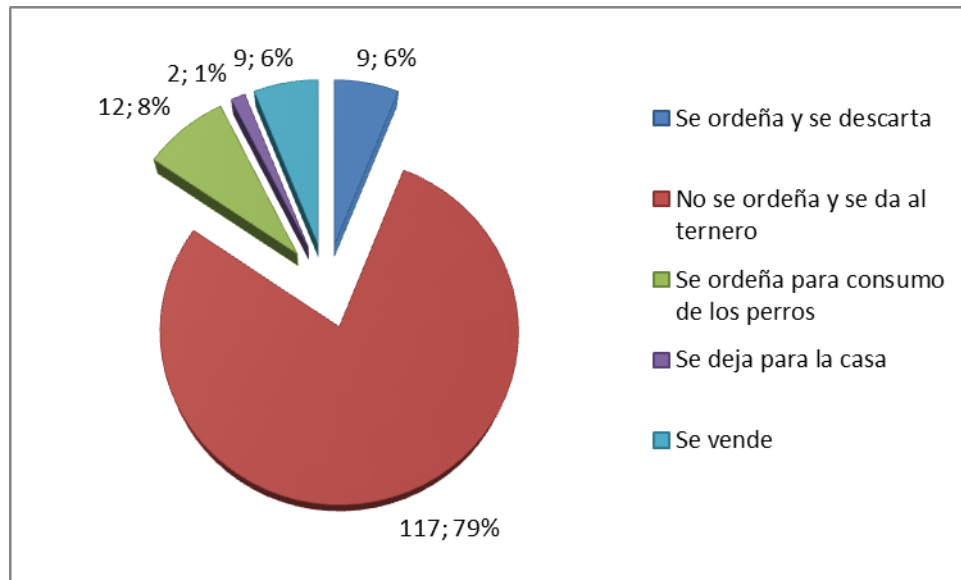
Grafica 2. Frecuencia de realización del CMT por las empresas ganaderas.

En la tabla 4 se presentan las características de la producción de leche cruda por cada centro de acopio.

Tabla 4. Características de la producción de leche cruda en las empresas ganaderas involucradas en el estudio.

Parámetro	n	Promedio	D.E	V. Mín.	V. Máx.
Volumen de leche día(Lts)	14 9	117.51	138.2 2	10	1010.0
Vacas en ordeño	14 9	31.37	31.05	3	220.0
Producción promedio/vaca(Lts. vaca)	14 9	3.70	0.99	2	9.0

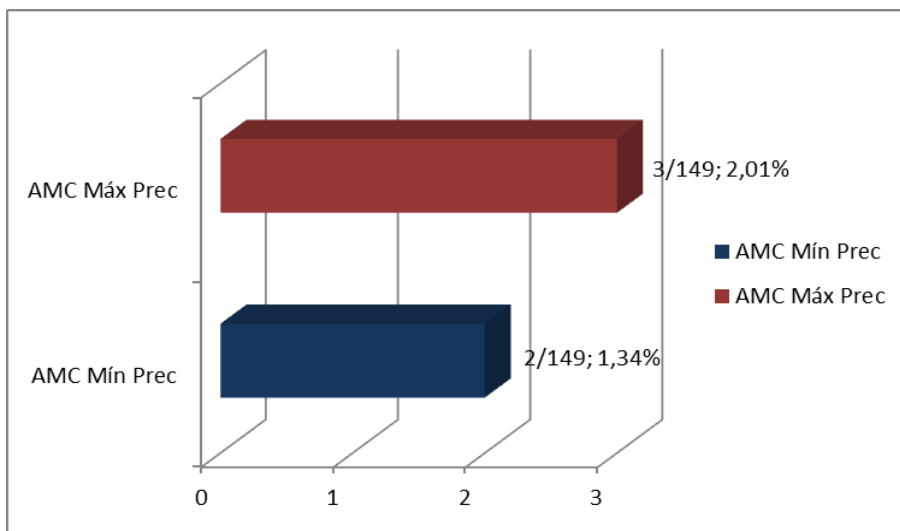
Al encuestar a las empresas sobre el manejo que le dan a la leche procedente de vacas que reciben tratamiento con antibióticos el 78,52% (117/149) manifiestan que no se ordeña y se da a los terneros (Gráfica 3)



Grafica 3. Manejo otorgado a la leche procedente de vacas con tratamiento antibiótico.

5.2 DETECCIÓN DE *Salmonella spp* EN MUESTRAS DE LECHE CRUDA PROVENIENTES DE EMPRESAS GANADERAS DOBLE PROPÓSITO DEL DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA

De las 149 empresas ganaderas doble propósito del departamento de Córdoba en estudio, en el 1,34 % (2/149) y en el 2,01 % (3/149) en mínima y máxima precipitación respectivamente se detectó *Salmonella spp* a partir de las muestras de leche cruda de cantina mediante aislamiento por microbiología convencional y confirmación por PCR donde se determinó el gen *InvA*, el cual se encuentra presente en todas las cepas de *Salmonella spp*. En la gráfica 4 se establece el número de aislamientos y la confirmación por PCR en las muestras positivas en temporada de mínima y máxima precipitación.



Grafica 4. Aislamientos de *Salmonella spp* en época de mínima y máxima precipitación. *AMC: Aislamiento por microbiología convencional.

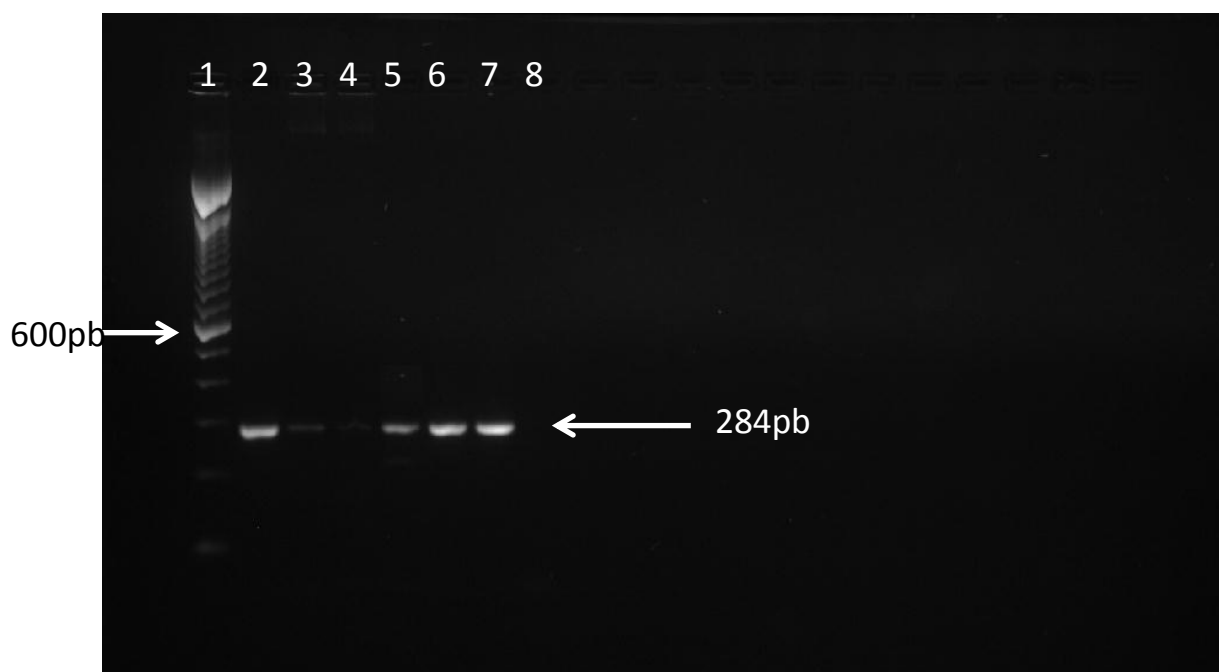


FIGURA 2. PCR para la detección del gen *invA* (284pb) de *Salmonella spp*. Carril 1: marcador de peso molecular (1000pb), Carriles 2-6: aislamientos de *Salmonella spp*, Carril 7: control positivo del banco de cepas de GIMBIC, Carril 8: control negativo.

5.3 DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIOTICOS PARA *Salmonella spp*

La determinación del perfil de susceptibilidad a 15 antibióticos para *Salmonella spp* mediante MICROSCAM arrojó como resultado sensibilidad a cada uno de los antibióticos evaluados.

CIM: Ampicilina/Sulbactam $\leq 8/4$; Ampicilina ≤ 8 ; Aztreonam ≤ 4 ; Cefepima ≤ 4 ; Cefotaxima ≤ 2 ; Ceftazidima ≤ 1 ; Ceftriaxona ≤ 1 ; Ciprofloxacino ≤ 1 ; Doripenem $\leq 0,5$; Ertapenem ≤ 1 ; Meropenem ≤ 1 ; Piperacilina/ Tazobactam ≤ 16 ; Piperacilina ≤ 16 ; Tigeciclina ≤ 1 ; Trimetopim/ Sulfa $\leq 2/38$.

6. DISCUSIÓN

Colombia es el tercer productor de leche en Sur América, el sexto en América y el vigésimo tercero en el mundo con un volumen aproximado de 6.500 millones de toneladas por año, por tanto los sistemas productivos se dividen en lechería especializada y doble propósito, se estiman alrededor de 23 millones de cabezas de ganado de las cuales se explotan 10 millones bajo el sistema de doble propósito (Documento Conpes). En el presente estudio realizado en empresas ganaderas doble propósito del departamento de Córdoba se encontró que el volumen promedio de leche al día es de 117.51 litros, obteniendo por cada vaca un volumen promedio de 3,70 litros.

Desde hace mucho tiempo la leche ocupa un lugar en la dieta de las familias colombianas así como ha sido fuente de ingresos económicos, la comercialización de la leche cruda es una práctica bastante difundida en Colombia, sin considerar que el manejo inadecuado sirve de transporte para la aparición de ETA (Olivero et al 2011)

Salmonella spp es un microorganismo que reviste importancia debido al problema de salud pública que puede generar. No está bajo el sistema de vigilancia de producción primaria y puede llegar a la leche mediante el proceso de ordeño, recipientes inadecuados para el depósito de leche, estiércol y contaminación cruzada entre otros (Manual BPP 2010). Como se evidenció en las fincas del estudio teniendo en cuenta los datos y resultados en cuanto a rutina de ordeño, el cual en el 99,3 % es de tipo manual, el establo destinado para ordeño en el 59,06 % es cubierto y el 41,62 % tiene pisos de cementos, indica una deficiencia con respecto a las instalaciones apropiadas para la rutina de ordeño según lo estipulado por el decreto 616 del 2006. El 97,99 % no cuenta con tanques de refrigeración lo cual se relaciona con las cifras de crecimiento de *Salmonella spp*. El 47,65 % de las empresas ganaderas presentes en el estudio no aplican CMT, el

58,39 % no cuenta con programa de prevención y control de brucelosis y un 80,54 % no aplican el programa de prevención y control de tuberculosis, reflejando que dentro de las limitaciones de los sistemas productivos, se encuentra la baja calidad higiénica de algunas zonas del trópico bajo donde se sitúa el departamento de Córdoba; el impacto que causan las enfermedades de control oficial y las que no están bajo programa de control oficial, así como la dificultad para la certificación de las zonas libres de brucelosis y tuberculosis; bajos niveles de implementación de buenas prácticas ganaderas al interior de las explotaciones y baja infraestructura de redes de frío (Patiño 2012).

Las buenas prácticas de higiene y sanidad son el reflejo de las excelentes condiciones de ordeño y el adecuado control sobre las ubres y el entorno, realizado por parte de los empleados; la imperfección puede dar lugar a una deficiente productividad y un bajo nivel nutritivo de la leche. Es oportuno destacar que la calidad higiénica se ve intercedida por varios factores en muy alto porcentaje como son las actividades del hombre en el proceso, la raza, la individualidad de la vaca, el estado de salud, la época del año, el estado de lactancia, la presencia de medicamentos, las prácticas de alimentación y de manejo (Méndez y Osuna 2007).

Salmonella spp causa entre 1-5 millones de casos anualmente en Estados Unidos y representa más del 50 % de todos los brotes de gastroenteritis de causa bacteriana, en España constituye el 50 % de los brotes de origen alimentario, en Perú entre 2010-2012 se reportaron en promedio 35 brotes de ETA por año, 47% se relacionaron clínicamente con casos agudos de salmonelosis. En Colombia en el año 2013 se notificaron al SIVIGILA por archivos planos 11213 casos de ETA y la leche, productos lácteos y sus derivados ocasionó el 17, 3 % de los brotes solo por detrás de alimentos mixtos que presentó un 47 % de los brotes (INS 2014).

En el presente estudio se determinó *Salmonella spp* a partir de 149 muestras de leche provenientes de empresas ganaderas doble propósito del departamento de Córdoba arrojando como resultado una prevalencia de 1,34 % en época de mínima precipitación y 2,01 % en época de máxima precipitación.

Estudios previos realizados por Patiño en el año 2012 en tres microrregiones de Colombia encontraron una prevalencia de 0,8 % para *Salmonella spp* en muestras de leche cruda, valor inferior al encontrado en el presente estudio, aunque la prevalencia para la región de la sabana de Córdoba y Sucre fue de 1,5 % (Patiño 2012), que se asemeja a la prevalencia obtenida en este estudio en la época de mínima precipitación pero no la podemos comparar ya que en el otro estudio no discriminan la época en las que las cepas fueron aisladas; las cepas fueron detectadas por microbiología convencional y por PCR, con reducción de 8 horas en la detección.

Reportes mundiales como el de Patna, India reportan una prevalencia de 7,7 %, 3,5 % y 5,6% en leche cruda, por microbiología convencional, serotipificación y detección del gen *InvA* por PCR respectivamente, prevalencias que son más altas que las encontradas en el presente estudio. Las diferentes prevalencias se pueden atribuir a la presencia de cepas rugosas mutada, carentes de las cadenas laterales específicas responsables de la especificidad del antígeno O, o a algunas anomalías adicionales en la estructura del núcleo (Purushottam 2014). En el año 2004 en Estados Unidos un estudio arrojó una prevalencia de 2,6 % en leche cruda de tanque (Kessel 2008). La presencia de *Salmonella spp*, implica falta de inocuidad del alimento y como consecuencia un severo riesgo para el consumidor, caso contrario a la ausencia del microorganismo en la leche cruda, como lo manifiesta en estudio en Argentina (Signorini 2008), donde no detectaron muestras positivas para *Salmonella spp* en leche, demuestra la existencia de una leche cruda de buena calidad para su industrialización.

Un estudio con muestreo en diferentes épocas del año realizado en el departamento de Sucre en el año 2013 en leche cruda de tanque arrojó como resultado una prevalencia para *Salmonella spp* en verano de 4,4 % y de 1,8 % en invierno (Martínez y Gómez 2013), lo cual dobla la prevalencia en épocas con altas temperaturas y no manifiesta mayor diferencia en cuanto a épocas donde la precipitación es mayor.

En los países con estaciones durante los meses de invierno los niveles de *Salmonella spp* tienden a cero y alcanzan su punto máximo en verano especialmente en el ganado bovino y los brotes también se presentan durante este período. En Colombia aún no se reportan datos sobre la temporalidad de los brotes en humanos. Se ha asociado que los casos de salmonelosis en humanos se presentan con mayor frecuencia pocos días después de temporadas con temperaturas altas (Huston 2008), por otra parte en Estados Unidos se ha encontrado mayor incidencia de *Salmonella spp* en fincas ganaderas durante los meses entre octubre y diciembre en lugar de los meses de verano.

La salmonelosis es una de las zoonosis más prevalentes en el mundo cuya ruta de transmisión puede ser por leche cruda, a pesar de los avances en el campo tecnológico y los esfuerzos educativos por mejorar el manejo de productos alimenticios a lo largo de la cadena de producción y comercialización, los brotes de ETA debido a *Salmonella spp*, siguen siendo frecuentes en particular los que involucran el consumo de alimentos lácteos. Las bacterias son normalmente destruidas por la pasteurización, pero en países como el nuestro, las bacterias patógenas constituyen un serio problema de salud pública, por la costumbre de consumir leche cruda y procesar algunos derivados lácteos a partir de leche cruda, donde está demostrado claramente su impacto. De tal forma que si se parte de la investigación realizada en el Caribe colombiano (Espinal 2006), donde se determinó que el 12,2 % de los aislamientos de *Salmonella spp* correspondieron a muestras de queso (9/74) y tomando estos 9 aislamientos como el 100 % se determina que el 33,3 % de los aislamientos se dio a partir de muestras de queso de la ciudad de Montería- Córdoba; por otra parte se presentaron 11 casos de intoxicación alimentaria en el 2001 y 346 casos en el año 2002 por *Salmonella spp* en el todo el departamento de Córdoba. Así como el estudio realizado en la ciudad de Santa Marta (Acosta 2013), donde se analizó un grupo de 65 muestras de alimentos de las cuales 5 correspondían a lácteos, arrojando como resultado la presencia de *Salmonella spp* en 4 de estas muestras, convirtiéndose el monitoreo de la leche en imprescindible para asegurar la calidad de los productos lácteos y sus derivados, asegurando así la seguridad alimentaria y contribuyendo

a mejorar la salud de la población. Durango et al documentaron la presencia de *Salmonella spp* en queso con un porcentaje de 7,9% (Durango 2004), manifestando un alto grado de contaminación; en un estudio realizado en queso duro blanco “tipo llanero” en el estado de Aragua, Venezuela, determinaron la presencia de *Salmonella spp*, teniendo una contaminación en el 2% de las muestras objeto de estudios (Scaramelli 1999).

Para reducir el desarrollo de las bacterias contaminantes y la velocidad de alteración, la leche obtenida en el ordeño debe enfriarse de manera rápida a 4°C y en condiciones ideales permaneciendo el menor tiempo posible en almacenamiento, la leche recién ordeñada está aproximadamente a una temperatura de 38°C. Se ha demostrado que las salmonellas sobreviven en queso durante largos períodos de tiempo es por ello que *Salmonella spp* puede sobrevivir por mucho tiempo bajo refrigeración, su inactivación ocurre durante la congelación, pero algunas cepas pueden permanecer viables, por otro lado su número declina lentamente sobre todo si la temperatura donde se almacena es alta, aunque esto más podría explicarse por el grado de acidez en temperaturas altas que se desarrolla en los quesos que por la temperatura misma, es preciso resaltar que a pesar que la asociación con la temperatura existe, se indica que la temperatura interna del humano y de los animales es constante, de modo que la temperatura no es el único factor que va a influir en la estacionalidad observada cuando se presentan los diferentes brotes

Al ver los estudios realizados para la detección de *Salmonella spp* en diferentes productos lácteos donde se ha documentado su presencia y en muchos casos las serovariedades implicadas, se presenta la necesidad de mejorar la calidad higiénico sanitaria de la leche cruda, mejorando la inocuidad de la misma. En contraste con los estudios anteriores, un estudio realizado en los municipios de Turbaco, Arjona y Carmen de Bolívar, Colombia, en suero costeño, producto artesanal de la región caribe colombiana, obtenido a partir de la fermentación de leche cruda que permite conservar sus ingredientes nutritivos, no se detectó la presencia de *Salmonella spp* (Grandos 2012), en ninguna de las muestras en

estudio, manifestando inocuidad de las muestras pero que no descarta la presencia del microorganismo en este tipo de alimento debido al bajo número de muestras procesadas y la dificultad de aislar *Salmonella spp* a causa del daño subletal.

El hallazgo de *Salmonella entérica* en alimentos es un serio riesgo para la salud por la asociación durante la infección con esta bacteria a gastroenteritis en sujetos inmunocompetentes, cuadros clínicos severos en sujetos inmunosuprimidos y con complicaciones focales en menor frecuencia, ahora bien, la infección debida a serovariedades es el resultado de una combinación de factores que se relacionan con el desarrollo en la industrialización en todas las fases de producción de alimentos, cambios en las prácticas de manejo, almacenamiento, distribución y preparación de los mismos, teniendo como consecuencia nuevos problemas en la higiene e inocuidad de los alimentos al originar una fácil diseminación de *Salmonella spp*. Las serovariedades de *Salmonella spp* son diferenciadas por los antígenos de superficie somático (O) y flagelar (H), en la subespecie I (*entérica*), se encuentran más del 95 % de los serovares que afectan a los humanos, *S. entérica serovar typhimurium*. *S. entérica serovar enteritidis*, son las serovariedades más comunes asociadas al consumo de alimentos (Eswarappa 2008, Kim 2006). En los reportes del sistema de vigilancia de Estados Unidos se han descrito diversos serovares presentes en leche cruda y productos lácteos. En el año 2001 en varios estados el serovar implicado fue *S. Newport* multirresistente, aislado en muestras de queso elaborado con leche cruda, en el año 2002 se vio implicado el serovar *S. typhimurium*, en leche cruda, crema de leche y mantequilla y en los años 2006, 2007 y 2010 se vieron implicados tanto *S. Newport* como *S. typhimurium*. En el estudio de Patna, India, en el año 2013 la serotipificación mostró que el 2,1 % correspondió a *S. typhimurium* y el 1,4 % a *S. Newport*. En Aragua, Venezuela una de las dos cepas aisladas a partir de queso blanco duro “tipo llanero” aglutinó con antisuero polivalente Poly A y fue negativa a los otros antisueros polivalentes, luego probaron con los sueros monovalentes incluidos dentro del polivalente y aglutinó sólo con el correspondiente grupo D (factor antigénico O) (Scaramelli 1999), lo anterior podría revertir particular importancia si

se considera que *S. typhi* y *S. dublin* pertenecen a dicho grupo, siendo ambas muy virulentas para el hombre; la tipificación de la cepa no fue posible. Según el estudio de Espinal, los serotipos circulantes en la región caribe colombiana que se aislaron de diferentes tipos de alimentos donde se incluye queso costeño son *S. anatum* (18,9 %), *S. uganda* (17,6 %), *S. newport* (12,2 %) y *S. typhimurium* (9,5 %). Lo anterior deja ver la importancia de llegar al serotipo de *Salmonella spp* para poder establecer relaciones epidemiológicas, las cuales se pueden correlacionar de igual forma con la susceptibilidad antimicrobiana (Muriel 2008), que en el presente arrojó como resultado la sensibilidad de *Salmonella spp* frente a todos los antibióticos utilizados, de ahí que en el presente estudio se hayan conservado los aislamientos para futuros estudios.

El aislamiento microbiológico de *Salmonella spp* mediante la utilización de medios de cultivos y la posterior identificación bioquímica han sido los métodos para el diagnóstico de salmonelosis y siguen siendo los métodos más usados para su detección (Casado 2008). Se necesita que la bacteria objeto de análisis forme una colonia en un medio de cultivo, puesto que se requiere un periodo de incubación, que lleva varios días ya que el microorganismo buscado puede ser minoritario y puede estar subletalmente lesionado, por esto deben usarse cultivos de recuperación y de enriquecimiento antes de utilizar los métodos selectivos, lo cual permite obtener al microorganismo en estado puro. En Colombia los procedimientos descritos por el INVIMA en el manual para análisis de alimentos 1998 son el referente para la detección y aislamiento de los microorganismos patógenos en alimentos. Los métodos convencionales para el aislamiento de *Salmonella spp* a partir de alimentos que han ganado aceptación con propósitos reglamentarios internacionales son los métodos oficiales de la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC), las Normas ISO, el método de Servicio de Inspección Alimentaria (FSIS) del departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y los Estándares franceses. Para el aislamiento de *Salmonella spp.*, en leche cruda se recomienda el método tradicional descrito por la FDA, el cual comprende un pre-enriquecimiento en medios no selectivos con el fin de recuperar las células con daño subletal, un enriquecimiento en medios selectivos

que contienen sustancias inhibidoras para evitar el crecimiento de microorganismos competidores, y la siembra en medios sólidos selectivos para diferenciar las colonias de *Salmonella spp*. Es importante destacar que es difícil eliminar en los métodos de detección la etapa de pre-enriquecimiento, ya que permite la recuperación de las células viables (Fung 2008). Es posible que la baja detección de *Salmonella spp* esté influenciada por factores como el pH ácido, baja disponibilidad de azúcares para su desarrollo o que los carbohidratos disponibles fueron consumidos por otro tipo de microorganismos que poseen menor tiempo de generación (Patiño 2012), es así como con los avances en el campo de la biología molecular es recomendable implementar técnicas como la PCR en la etapa de pre- enriquecimiento, debido que presenta mayor sensibilidad y especificidad en comparación con el método microbiológico convencional que sigue siendo considerado como la prueba de oro o “gold standard”; el uso de la PCR en esta etapa hace suponer que se detectará mayor número de *Salmonella spp*, a sabiendas de que en esta etapa es donde se recuperan las cepas viables y la influencia de los factores que pueden afectar su detección como se ha manifestado anteriormente va a ser menor por la reducción de los tiempos, teniendo claro que en Colombia se establece dentro de la legislación “Cero tolerancia” para *Salmonella spp*, en función de dicha legislación es necesario implementar técnicas rápidas y muy sensibles en el control de la industria.

En el estudio se confirmaron las 5 cepas aisladas por microbiología convencional mediante la implementación de PCR, utilizando como diana genética el gen *InvA*, amplificando todas para 284 pb, este estudio tiene similitud con el realizado en la región caribe colombiana (espinal 2006), donde el gen *InvA* se presentó en el 97,3 % de las cepas de *Salmonella spp*; en tanto en la India detectaron la presencia del gen *InvA*, en el 72,7 % de las cepas caracterizadas bacteriológicamente (Purushottam 2014). Las principales ventajas del uso de la PCR en la detección e identificación de *Salmonella spp*, radica en la sensibilidad, especificidad y capacidad de procesamiento de grandes cantidades de muestras. En años recientes se ha desarrollado un proyecto europeo denominado “Food-PCR” cuyo objetivo es facilitar la implementación de PCR para la detección de los patógenos

Campylobacter spp. termofílico, E. coli O157, Yersinia enterocolítica, Listeria monocytogenes y Salmonella spp., mediante la validación y estandarización de las metodologías de PCR.

Producir leche con buena calidad higiénica resulta sumamente complejo ya que el producto a manejar es extremadamente delicado a la manipulación durante su recolección, es así como la calidad de la leche comercial es uno de los pilares en la industria láctea, dependiendo directamente de las características del producto original; por lo tanto, en un alto porcentaje la calidad del producto que llega al consumidor se debe al control sobre la leche cruda en la finca; es importante precisar que algunos de los problemas que afectan la competitividad del sector lácteo colombiano pueden deberse a la falta de análisis y evaluación microbiológica del producto, de este modo es acertado mejorar las actividades relacionadas con la rutina de ordeño para garantizar la calidad de la leche, a través del control microbiológico y sanitario, cumpliendo con las normas establecidas, mejorando la competitividad, la cual es fundamental, ya que constituye un eje estratégico de participación en el mercado nacional e internacional, siendo necesario ofrecer a los productores herramientas de análisis que le ayuden a la obtención de leche de buena calidad cumpliendo con las medidas higiénicas y sanitarias establecidas para la región y para el país, con el objeto de asegurar inocuidad del alimento y mejores beneficios económicos.

7. CONCLUSIONES

- El análisis microbiológico realizado a las muestras de leche cruda de empresas ganaderas doble propósito del departamento de Córdoba arrojó una prevalencia de *Salmonella spp* en época de mínima precipitación de 1,34 % y en máxima precipitación de 2,01 %.
- Todas las cepas detectadas por microbiología convencional fueron confirmadas por PCR mediante la detección del gen *InvA*.
- La evaluación de la sensibilidad de los aislados de *Salmonella spp* obtenidos frente a antibióticos, Demostraron no variabilidad entre las cepas.
- Los niveles de prevalencia pueden ser reducidos mediante la adopción de buenas prácticas de higiene y el uso adecuado de tanques de refrigeración.
- Los resultados obtenidos indican la importancia de evaluar la leche cruda para determinar la presencia de *Salmonella spp* a nivel de empresas ganaderas como una medida de seguridad alimentaria.

8. RECOMENDACIONES

- Continuar los estudios, clasificando las cepas aisladas mediante técnicas como serotipificación y/o electroforesis de campo pulsado.
- Estandarizar una PCR en la fase de pre- enriquecimiento, debido a que *Salmonella spp* no es fácil de aislar y se disminuiría el tiempo de detección.
- La presencia de *Salmonella spp* en muestras de leche cruda procedentes del sistema doble propósito sugiere la necesidad implementar un programa de gestión de aseguramiento de la calidad en el eslabón primario de la cadena láctea que permita la obtención de una materia prima óptima.

9. BIBLIOGRAFÍAS

1. Acosta L, Pinedo J, Hernández E, Villareal J. Comparación de los métodos de inmunoensayo enzimático automatizado (VIDAS) y PCR para la detección de *Salmonella spp* en expendios de la ciudad de Santa Marta-Colombia. Rev Salud Uninorte. 2013 May/Aug; 29 (2): 2-6
2. Alcázar C, Rubio M, Núñez F, Alonso R. Detección de *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* en quesos frescos y semimaduros que se expenden en vía pública en la ciudad de México. Red de rev Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. 2006 Oct-Dic; 37 (4): 417-429
3. Aliverti V. Detección y validación intra-laboratorio de una metodología para la detección *Salmonella spp* en carne bovina molida. Desarrollo de estrategias de prevención y control. 2012; Tesis Maestría en Tecnología e Higiene de los Alimentos. Universidad Nacional de la Plata.
4. Amini K, Salehi T, Nikbakht G, Ranjbar R, Amini J, Banou Sh. Molecular detection of *InvA* and *spv* virulence genes in *Salmonella enteritidis* isolated from human and animals in Iran. J African Microbiol. 2010; 4 (21): 2202-2210.
5. Boletín epidemiológico semana 35. 2014. Instituto Nacional de Salud. Disponible en: http://ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2014%20Boletin%20epidemiologico%20semana%2035.pdf?Mobile=1&Source=%2Fboletin-epidemiologico%2F_layouts%2Fmobile%2Fmblwp.aspx%3FUrl%3D%252Fboletin-epidemiologico%252FPaginas%252Fdefault.aspx%26CurrentPage%3D1.

6. Brunia A. Foodborne Microbial Pathogens. 2008. Ed Springer USA pp 201-216.
7. Caffer M, Terragno R. Manual de procedimientos diagnóstico y caracterización de Salmonella spp. Centro Regional de referencia del WHO Global Salm Surv para América del sur. 2008; http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/Argentina-Levell/Manual_procedimientos_Salmonella.pdf
8. Cardona N, Sánchez M. Evaluación de la capacidad de serovariedades de Salmonella enterica a células Hep-2. Red rev América Latina, el Caribe, España y Portugal. 2005 Jul 2; 19 (2): 7-17
9. Casado M, Torrico G, Medina M. Medios de cultivos en un laboratorio de microbiología. 2012 Disponible en <http://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>
10. Castro A, Salvatella R, Álvarez V, Savio M, Olea A, Ameztoy I. Guía para el establecimiento de sistemas de vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por alimentos (VETA) y la investigación de brotes de toxiinfecciones alimentarias. CEPIS-OPS-OMS. <http://www.cepis.ops-oms.org/bvstox/e/fulltext/guiaveta/guiaveta.pdf>
11. Castro D, Mosquera G. El panorama de las ETAs en Colombia. 2012; <http://www.revistaalimentos.com.co/ediciones/ediciones-2013/edicion-32/food-safety-2/el-panorama-de-las-et-as-en-colombia.htm>
12. CDC. Leche cruda (Sin pasteurizar). Especiales CDC. <http://www.cdc.gov/spanish/especialescdc/lechecruda/> 3/

13. Chacón L, Barrantes K, García C, Achí R. Estandarización de una PCR para la detección del gen *InvA* de *Salmonella spp* en lechuga. Rev Soc venezolana Microbiol. 20120; 30:18-23
14. Conde M. Caracterización epidemiológica de las EDAs causadas por: *Salmonella spp* y *Shigella spp* en niños de 6 meses a 5 años de edad en el hospital boliviano holandés en agosto a noviembre de 2004. Tesis Licenciatura en Bioquímica. Universidad Mayor de San Andrés.
15. D' Aoust J. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. International J of food Microbiology. 1991; 12: 17-40
16. Decreto 616 de 2006 28 de Febrero. Ministerio de Protección Social.
Available from:
http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/2006103010449_decreto_616_28_02_06.pdf
17. Decreto 3075 de 1997. Ministerio de Salud. Available from:
https://www.invima.gov.co/index.php?option=com_content&view=article&id=484:decreto-3075-1997&catid=96:decretos-alimentos&Itemid=2139.
18. Derakhshandeh A, Firouzi R, Khoshbakht R. Association of three plasmid-encoded *spv* genes among different *Salmonella* serotypes isolated from different origins. Indian J Microbiol. 2013 Jan-Mar; 53(1):106-110.
19. Días S, Rodenbush C, Michael G, Cardoso M, Wageck C, Brandelli A. Detection of virulence genes in *Salmonella enteritidis* from different sources. Braz J Microbiol. 2003; 34 supl 1.

20. Díaz T, Valdés M, Caballero A, Monterrey P. Enfermedades transmitidas por alimentos. Causas más frecuentes en los niños. From Available: <http://bvs.per.paho.org/texcom/colera/etasninos.pdf>
21. Documento Conpes. Consolidación de la política sanitaria y de inocuidad para las cadenas lácteas y cárnicas. 2010. Bogotá D.C. disponible en <http://www.ica.gov.co/getattachment/3b31038a-72ba-40f9-a34d-cecd89015890/2010cp3676.aspx>
22. Durango J, Arrieta G, Mattar S. Presencia de *Salmonella spp* en un área del caribe colombiano: un riesgo para la salud pública. Biomédica. 2004; 24:89-96
23. Espinal P, Prieto E, Otero V, Máttar S. Presencia del gen de invasividad *invA* en cepas de *Salmonella spp* aisladas de alimentos del caribe colombiano. Rev Cubana Salud Pub. 2006.
24. Eswarappa S, Janice J, Nagarajan A, Balasundaram S, Karnam G, Dixit N, Chakravorty D. Differentially evolved genes of *Salmonella* pathogenicity islands: insights into the mechanism of host specificity in *Salmonella*. PLOS one. 2008; 3(12):3829.
25. FDA 2012. Los peligros de la leche cruda: La leche sin pasteurizar puede representar un riesgo grave para la salud. Disponible en <http://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/Consumers/ucm210577.htm>
26. Figueroa I, Verdugo A. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella sp*. Rev Latinoamericana de microbiología. 2005, Ene-Jun. 47 (1-2): 25-42.
27. Fung DY. Rapid methods and automation in Microbiology: 25 years of development and predictions. Revista de tecnología e higiene de los alimentos 2008; 392: 113-117.

28. García D, Carreño M, Alcayaga S, Ulloa J. Descripción clínica y epidemiológica de un grave brote de salmonelosis transmitida por alimentos. Rev chil. Infectol. 2012 Abr. 29 (2): 132-137.
29. Grandos C, Acevedo D, Torres R. Calidad de la leche y del suero costeño de los municipios de Turbaco, Arjona y Carmen de Bolívar Colombia. Rev Lasallista de investigación. 2012 Jul/Dec; 9 (2)
30. Hohmann E. 2001. Nontyphoidal Salmonellosis clinical infectious diseases. 32: 263-269.
31. Huston C., Wittum T, Love BC. Persistent fecal Salmonella shedding in five dairy herds. Journal of the American Veterinary Medical Association 2002; 220: 650-655.
32. INFOSAN 2005. Red Internacional de Autoridades de Inocuidad de los Alimentos. Resistencia Antimicrobiana a Salmonella. Disponible en http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_03_Salmonella_Apr05_sp.pdf
33. Instituto geográfico Agustín Codazzi Colombia. http://www.igac.gov.co:8080/igac_web/contenidos/home.jsp [10 20 2009].
34. Instituto Nacional de Salud, informe de evento: enfermedades transmitidas por alimentos, hasta el período epidemiológico 13 del año 2012, Bogotá D.C, 2012.
35. Instituto Nacional de Salud. Identificación de riesgos biológicos asociados al consumo de leche bovina. 2011.
36. Instituto Nacional de Salud. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). 2014.

37. Kampelmacher E. La salmonellosis, responsable de intoxicaciones alimenticias. Métodos de prevención para reducir la incidencia de las *Salmonellae* y armonización de los métodos de investigación mediante su normalización. Rev. Sci. Tech. Off.int. Epi. 1983. 2 (4): 977-995.
38. Kessel V, Karns JS, Wolfgang DR, Hovingh E, Jayarao BM, Van Tassel CP, Shukken YH. Environmental sampling to predict fecal prevalence of *Salmonella* in an intensively monitored dairy herd. Journal of Food Protection 2008; 71(10): 1967–1973.
39. Kim H, Park S, Kim H. Comparison of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* LT2 and non-LT2 *Salmonella* genomic sequences, and genotyping of Salmonellae by using PCR. Appl Environ Microbiol. 2006; 72(9):6142.
40. Manual Buenas Practicas Pecuarias en unidades de producción de leche bovina. México. 2010. Disponible en [http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con3_uibd.nsf/AC86F16E9A3299F90525798100762178/\\$FILE/manual_leche_bovina.pdf](http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con3_uibd.nsf/AC86F16E9A3299F90525798100762178/$FILE/manual_leche_bovina.pdf)
41. Kopper G, Calderón G, Schneider Sh, Domínguez W, Gutiérrez G. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. 2009.
42. Martínez I. (2011) Desarrollo de métodos de detección de *Salmonella* basados en la reacción en cadena de la polimerasa y su validación en muestras alimentarias. Tesis Doctoral. Universidad de país Vasco.
43. Martínez M, Gómez C. Calidad composicional e higiénica de la leche cruda recibida en industrias lácteas de Sucre, Colombia. Biotecnología en el sector Agropecuario y agroindustrial. 2012 Jul-Dic; 11 (2): 93-100.

44. Méndez M, Osuna E. Caracterización de la calidad higiénica y sanitaria de la leche cruda en algunos sistemas productivos de la región del alto de Chicamocha (Departamento de Boyacá). 2007. Trabajo de grado para optar por el título de médico veterinario. Universidad de la Salle, Bogotá.
45. MPS. Ministerio de Protección Social 2011. Perfil de riesgo *Salmonella* spp (no tifoideas) en pollo entero y en piezas. <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/investigacion/ueria/Publicaciones/PERFIL%20SALMONELLA%20SPP.pdf>
46. MPS. Ministerio de Protección Social 2014. Protocolo de vigilancia en salud pública Enfermedades transmitidas por alimentos. <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Enfermedades%20Tras.%20por%20alimentos.pdf>
47. Muriel M. Estimación de la incidencia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) en Colombia en la década de 1996-2006. 2008; Tesis Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias.
48. Olivero R, Aguas Y, Cury K. Comercialización de leche cruda en Sincelejo, Sucre, Colombia. *Rev colombiana cienc. Anim.* 2011; 3 (1).
49. Parra M, Durango J, Máttar S. Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *MVZ-Córdoba*. 2002; 7 (2): 187-200.
50. Parrilla M, Vásquez L, Saldate O, Nava L. Brotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. *Salud pública Mex* 1993; 35 (5): 456-463.

51. Patiño R. Detección de *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*, en muestras de leche bovina del sistema de producción doble propósito colombiano. 2012; Tesis Biotecnología agrícola e industrial. Pontificia universidad javeriana, facultad de ciencias, maestría en ciencias biológicas.
52. Purushottam K, Kumari S, Sanjay K, Shanker D. Isolation and prevalence of *Salmonella* from chicken meat and cattle milk collected from local markets of Patna, India. Veterinary World. 2014; 7 (2): 62-65.
53. Saravia J. 2008. Salmonelosis. Sección de enfermedades infecciosas. Hospital San Juan de Dios. Bogotá-Colombia.
54. Scaramelli A, Citti R, González I, Páez L, Tromp J. Investigación de *Salmonella sp* en muestras de queso blanco duro “tipo llanero” del distrito sanitario 1 del estado Aragua, Venezuela. Rev Científica, FCV-Luz. 1999; 9 (3): 167-173.
55. Search all of NY.gov 2012. Los peligros de la leche cruda disponible en http://www.health.ny.gov/es/diseases/communicable/raw_milk_related/dangers_of_drinking_raw_milk.htm.
56. Signorini M, Sequeira G, Bonazza J, Dalla R, Martí L, Frizzo L, et al. Utilización de microorganismos marcadores para la evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias en la producción primaria de leche. Rev científica, FCV-LUZ. 2008; 13 (2): 207-217.
57. Yáñez E, Máttar S, Durango A. Determinación de *Salmonella spp* por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. Asociación col. Inf. 2008.

10. ANEXOS

ANEXO 1.

ENCUESTA REALIZADA A LAS EMPRESAS GANADERAS

Muestra. _____

Fecha: _____

Nombre de la empresa ganadera _____

Municipio _____ Empresa _____

Ruta _____

1-La empresa ganadera está dedicada únicamente a la producción de leche: Si ☐ No ☐

2- Cuales _____

3-Volumen de leche producida _____

4- vacas en ordeño _____

5-Tipo racial predominante: _____

6-Hay otros animales para producción de leche (Búfalos): Si ☐ No ☐

7-Hay presencia de perros durante el ordeño: Si ☐ No ☐

8-Ordeño a mano: Si ☐ No ☐

9- Ordeño con equipo: Si ☐ No ☐

10- Los ordenadores son hombres: Si ☐ No ☐

11- Hay mujeres que ordeñen: Si ☐ No ☐

12- Hay tanque de refrigeración: Si ☐ No ☐

13- Hay establo únicamente para el ordeño: Si ☐ No ☐

14- Esta la empresa en el programa de hatos libre de brucelosis: Si ☐ No ☐

15- Esta la empresa en el programa de hatos libres de tuberculosis: Si ☐ No ☐

16- Hay casos de mastitis clínica durante el último mes: Si ☐ No ☐

17- Hacen la prueba del CMT: Si ☐ No ☐

18- Con qué frecuencia hacen el CMT _____

19- Sabe que son los inhibidores en leche: Si ☐ No ☐

20- Cuando le aplican a una vaca en ordeño antibióticos que hacen con la leche:

21- Filtran la leche: Si ☐ No ☐

22- Tipo de filtro _____

23- En el sitio de ordeño hay presencia abundante de lodo: Si ☐ No ☐

24- El sitio de ordeño es cubierto: Si ☐ No ☐

25- Suplementan a las vacas para la producción de leche: Si ☐ No ☐

26- Que tipo de suplemento: _____